

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：22604

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21112007

研究課題名(和文)被子植物における配偶子融合の分子認証機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of gamete recognition and fusion in angiosperms

研究代表者

岡本 龍史(Okamoto, Takashi)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：50285095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 63,400,000円、(間接経費) 19,020,000円

研究成果の概要(和文)：

被子植物における配偶子融合過程および受精卵の活性化・初期発生過程の分子基盤を明らかにすることを目的として、研究を推進した。イネ雌雄配偶子・受精卵のオーム解析および同定遺伝子の機能解析により、生殖過程に關与する遺伝子が特定された。さらには、受精卵中における核融合(核の合一)過程の動態観察、および核合一ステージを指標とした初期発達受精卵の分子生物学的解析により、受精誘導性遺伝子の発現機構の一端を明らかにした。

これらの結果は、発生学および植物学分野に対する共通基礎的な知見を提供し、かつ、卵細胞から受精卵への変換メカニズムを支える分子基盤の解明につながるものである。

研究成果の概要(英文)：

Investigations for elucidating the mechanisms in plant reproduction and development, including how the egg cell is specialized, fuses with the sperm cell, and converts into an active zygote, were conducted. Cell-type-specific transcriptomes and proteomes were obtained using rice gametes and zygotes, and several rice or Arabidopsis lines with mutations in genes identified by present analyses showed clear phenotypic defects in seed set or seed development. The conversion of an egg cell into a zygote involves two sequential gametic processes, plasmogamy and karyogamy. The nuclei and nuclear membranes of rice gametes were fluorescently labeled, and such gametes were fused in vitro to observe karyogamy progression. Karyogamy was divided into eight stages, and paternal and de novo synthesized transcripts were separately detectable in zygotes. These results provide foundational information toward understanding the mechanisms of gametic and early zygotic development in angiosperms.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：卵細胞 精細胞 受精 植物 配偶子融合 核の合一

## 1. 研究開始当初の背景

被子植物は、重複受精を行うことにより胚と胚乳からなる種子をつくり出す。一般的に被子植物の胚嚢（雌性配偶体）は、核相が  $n$  の卵細胞 1 個、助細胞 2 個、反足細胞 3 個、および核相が  $2n$  の中央細胞 1 個の 7 細胞 8 核で構成されており、花粉管によって胚嚢内へと運ばれた 2 個の精細胞の一方が卵細胞と、他方が中心細胞と融合して胚および胚乳へとそれぞれ発達する。被子植物の受精は、(I) 花粉管による精細胞の胚嚢内への輸送と (II) 精細胞-卵細胞および精細胞-中心細胞の融合の二つの過程に分けて考えることができ、(I) の過程については、自家不和合性、花粉管の発芽、伸長および胚嚢へのガイダンス機構の分子基盤に対する知見が急速に増えつつあった。一方で、(II) の配偶子の細胞融合過程については、「2 個の精細胞がどのように分別されて（あるいは分別されずに）卵細胞と中心細胞に 1 細胞ずつ接着するのか」、「精細胞-卵細胞および精細胞-中心細胞の膜融合にはどのような分子が関与しているのか」、「精細胞-卵細胞および精細胞-中心細胞の融合機構に違いはあるのか」、などといった「どのような機構で 2 個の精細胞がそれぞれ卵細胞と中心細胞と融合（受精）するのか」という問いに集約される植物の受精の本質的な現象に対する知見は非常に少なく、その機構解明が待たれていた。

受精は、上述した雌雄配偶子の細胞膜融合と、それに引き続く融合細胞（受精卵）中における雌雄核の融合（核の合一）により完了する。被子植物においては、卵細胞が精細胞との融合によって活性化し、受精卵中での卵核と精核の合一が進行する。その後、受精卵では胚発生に向けた遺伝子の新規発現が始まる。このように雌雄核の合一は、受精卵の活性化と胚発生を仲介する重要な過程である。しかし、厚い子房組織内で進行する受精・発生過程の中でも、核の合一は受精直後のごく初期に進行することから、その過程を直接的に観察・解析することが困難である。そのため、核合一過程の中の核膜融合やクロマチンの脱凝集といった、ある一過程に焦点を当てた解析例は多いが、核合一の全過程を包括的に観察・解析した例は極めて少なく、さらには、核合一過程と受精誘導性遺伝子群の発現開始時期との関連性はこれまで明確に示されていなかった。

## 2. 研究の目的

植物の受精および初期胚発生機構に関する研究が動物に比べて遅れている原因のひとつとして、植物の受精が子房の奥底で進行するために受精過程の直接的観察・解析が困難であること、および、モデル植物から精細胞、卵細胞や中心細胞を確実に単離し *in vitro* で受精させる実験系が確立されていなかった点が挙げられる。本申請課題は、イネ単離配偶子を材料として、*in vitro* 受精系、1

細胞分子生物学、高感度オーム解析、レーザーマイクロインジェクションによる配偶子操作などの手法を駆使し、植物における配偶子融合過程および受精卵の活性化・初期発生過程の分子基盤を明らかにすることを目的とし、研究を推進した。

## 3. 研究の方法

(1) イネ配偶子および受精卵のトランスクリプトーム解析：イネ卵細胞（31~111 細胞、4 反復）、精細胞（約 3,000 細胞、2 反復）、受精卵（30~33 細胞、3 反復）、花粉（3 反復）について、マイクロアレイ解析を行った。

(2) イネ配偶子のプロテオーム解析：500 個のイネ卵細胞を SDS-PAGE で展開・銀染色したのち、ゲルを 15 断片に分け、それぞれトリプシン処理後にオービトラップ型 MS/MS で解析した。精細胞（約 3 万個）、花粉、カルスおよび芽生えについても同様に解析した。

(3) 核の合一の動態観察、および受精誘導性遺伝子の初期発現：受精卵中における雌雄核の融合過程および受精卵核の分裂過程の可視化に向けて、Histone H2B-GFP により核内クロマチンを、SUN2-GFP により核膜を、Lifeact-tagRFP によりアクチン繊維をそれぞれ蛍光標識したイネ形質転換体を作成した。それら形質転換体から配偶子を単離し、卵細胞の核、核膜、アクチン繊維、および精細胞の核、核膜が可視化されていることを確認したのち、それら配偶子を用いた *in vitro* 受精系により融合させ、受精卵中における核クロマチンの動態、および受精誘導性遺伝子の発現プロファイルと核合一の関係性を観察・解析した。

(4) イネ卵細胞・受精卵への物質導入系の確立：上記 (1) および (2) の解析により同定されると期待される受精・初期発生関連因子の候補遺伝子の機能解析に向けて、イネ卵細胞および受精卵への物質導入系の確立を試みた。

## 4. 研究成果

(1) イネ配偶子および受精卵のトランスクリプトーム解析：上記研究 (1) の結果についてクラスタリングおよび相関性解析を行ったところ、各細胞（組織）の反復実験間において高い再現性がみられた（図 1）。これらのデータ解析により、イネ雌性または雄性配偶子で特異的に発現する遺伝子、および受精後に発現が誘導あるいは抑制される遺伝子が同定された。それらのうちから、生殖もしくは発生機構に関連する可能性が高いと推定される 13 遺伝子への T-DNA またはトランスポゾン挿入変異体のイネ種子を入手し、生殖または胚発生過程に異常がある可能性が高い変異体を特定した。さらに、上記遺伝子

群のオルソログ遺伝子をシロイヌナズナで検索し、当該遺伝子に変異をもつシロイヌナズナの稔実率調査、次世代における変異の分離検定、および交配実験などを行い、生殖あるいは胚発生・胚乳形成に関与すると推定される遺伝子を同定した。

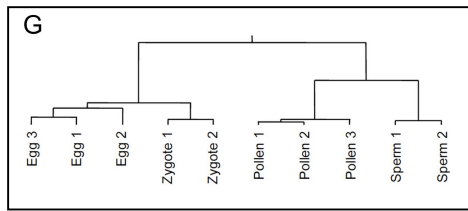


図 1. マイクロアレイデータのクラスタリング解析。Centered Pearson correlation および algorithm with complete linkage を使用してクラスタリング解析を行った。

(2) イネ配偶子のプロテオーム解析：上記研究 (2) の結果、卵細胞では 1,367 種のタンパク質、精細胞では 1,160 種のタンパク質が同定された。さらに、比較プロテオーム解析により、102 個の卵細胞特異的タンパク質、および 77 個の精細胞特異的タンパク質を特定した。それら配偶子特異的タンパク質をコードするイネ遺伝子群の一部、およびそれらのシロイヌナズナオルソログ遺伝子の変異体植物について解析を進めたところ、5 遺伝子について生殖過程に関与する可能性が示された (図 2)。

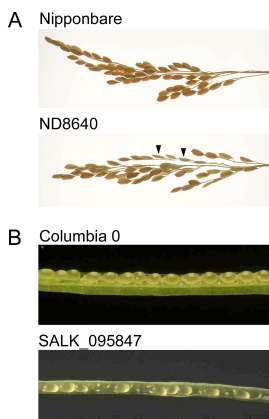


図 2. 生殖過程に異常が生じているイネ変異体 (A)、およびシロイヌナズナ変異体 (B)

(3) 核の合一の動態観察、および受精誘導性遺伝子の初期発現：上記研究 (3) の結果、配偶子融合後 10~30 分間で精細胞核はアクチン繊維依存的に卵細胞核と接するようになり (図 3)、次に、卵核クロマチンの精核内への流入が見られた (図 4)。その後、融合後 30~70 分から、融合核内で精核クロマチンの脱凝集が始まり、融合後 240 分程には精核のクロマチンが融合核内に均一に広がる様子が観察された (図 4)。これら観察結果から、被子植物の受精卵における核合一過程の経時的な動態が明らかとなり、核合一過程を 8 つのステージに分類することが可能になった。

これら細胞生物学的解析に加えて、各々の

核合一ステージにある受精卵中における受精誘導性遺伝子の発現プロファイルを調べるため、これまでに同定されている 20 個の受精誘導性遺伝子について、各々の核合一ステージにおける発現レベルを PCR 法で解析した。その結果、それら遺伝子を以下 (A)~(C) の発現パターンを示すものとして分けることができた。(A) 核合一前の受精卵内で既に転写産物が存在し、精細胞 mRNA 由来の転写産物であると考えられるもの、(B) 精核クロマチンの脱凝集期に転写が開始されるもの、(C) 核合一の完了後 (ステージ VIII 以降) に転写が開始されるもの。これらにより、卵細胞が受精卵へと変換する過程である核の合一の詳細な動態が明らかにされたと共に、核合一ステージを指標とした受精卵中における遺伝子発現解析が可能であることが示された。

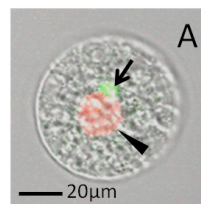


図 3. 精核クロマチンを H2B-GFP、卵核クロマチンを H2B-RFP でそれぞれ標識した配偶子を融合させて作製した受精卵。融合後、約 20 分の像を示している。矢印と矢頭は、それぞれ精核と卵核を示す。

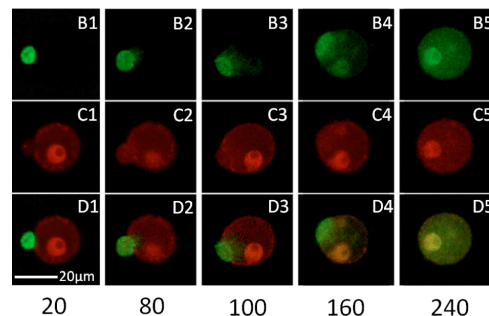


図 4. 核合一過程の経時的観察。緑は精核クロマチン (H2B-GFP)、赤は卵核クロマチン (H2B-RFP) 由来のシグナルを示す。

(4) イネ卵細胞・受精卵への物質導入系の確立：上記研究 (4) の結果、受精卵においては、アガロースゲルに包埋したのちに Laser-assisted Thermal-expansion Microinjection 法を用いることで、導入効率および導入後生存率を、約 100 および 70% にまでそれぞれ向上させることに成功した。卵細胞に関してはインジェクションが非常に困難であったことから、PEG-Ca<sup>2+</sup> 法を用いて DNA 導入を行った。その結果、卵細胞中における一過的遺伝子発現が確認された。

これら (1)~(4) の研究成果は、植物の生活環における発生過程の中でも知見の少ない「配偶子融合直後の受精過程および受精卵の初期発生機構」の一端を明らかにし、発生学および植物学分野に対する共通基礎的な知見を提供し、かつ、卵細胞から受精卵

への変換メカニズムを支える分子基盤の解明につながるものと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

- ① Abiko M., Furuta K., Yamauchi Y., Fujita C., Taoka M., Isobe T., and Okamoto T. (2013) Identification of proteins enriched in rice egg or sperm cells by single-cell proteomics. *PLoS ONE* 8(7): e69578. doi: 10.1371/journal.pone.0069578.
- ② Abiko M., Maeda H., Tamura K., Hara-Nishimura I. and Okamoto T. (2013) Gene expression profiles in rice gametes and zygotes: Identification of gamete-enriched genes and up- or down-regulated genes in zygotes after fertilization. *J. Exp. Bot.* 64: 1927-1940. doi: 10.1093/jxb/ert054.
- ③ Okamoto T. (2011) In vitro fertilization with isolated rice gametes: production of zygotes and zygote and embryo culture. *Methods Mol. Biol.* 710: 17-27. doi: 10.1007/978-1-61737-988-8\_2.
- ④ Ohnishi T., Takanashi H., Mogi M., Takahashi H., Kikuchi H., Yano K., Okamoto T., Fujita M., Kurata N. and Tsutsumi N. (2011) Distinct gene expression profiles in egg and synergid cells of rice as revealed by cell type-specific microarrays. *Plant Physiol.* 155: 881-891. doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.167502
- ⑤ Okamoto T. (2010) Gamete fusion site on the egg cell and autonomous establishment of cell polarity in the zygote. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 1464-1467. doi: 10.4161/psb.5.11.13468.
- ⑥ Nakajima K., Uchiumi T. and Okamoto T. (2010) Positional relationship between the gamete fusion site and the first division plane in the rice zygote. *J. Exp. Bot.* 61: 3101-3105. doi: 10.1093/jxb/erq131.
- ⑦ Sato A., Toyooka K., and Okamoto T. (2010) Asymmetric cell division of rice zygotes located in embryo sac and produced by in vitro fertilization. *Sex Plant Reprod.* 23: 211-217. DOI 10.1007/s00497-009-0129-9
- ⑧ Uchiumi T. and Okamoto T. (2010) Rice fruit development is associated with an increased IAA content in pollinated ovaries. *Planta* 232: 579-592. DOI 10.1007/s00425-010-1197-7.
- ⑨ Takanashi, H., Ohnishi, T., Mogi, M., Okamoto, T., Arimura, S and Tsutsumi N.

(2010) Studies of mitochondrial morphology and DNA amount in the rice egg cell. *Curr. Genet.* 56:33-41. DOI 10.1007/s00294-009-0277-3.

- ⑩ Wang S. and Okamoto T. (2009) Involvement of polypyrimidine tract-binding protein (PTB) related proteins in pollen germination in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 50: 179-190. doi: 10.1093/pcp/pcp059.

[学会発表] (計7件)

- ① Onishi, Y., Abiko, M., Okamoto, T. Relationship between karyogamy progression and onset of de novo gene expression in rice zygotes produced by in vitro. 23rd International Congress on Sexual Plant Reproduction (2014年7月, Port, Portugal).
- ② Toda, E., Ohnishi, Y., Okamoto, T. (2014) Dynamics of male and female chromatin during karyogamy in rice zygotes. 23rd International Congress on Sexual Plant Reproduction, Port (2014年7月, Port, Portugal).
- ③ 大西由之佑、岡本龍史 「イネ受精卵中の核合一過程の観察および核融合における雌雄配偶子の機能」日本植物学会第77回大会 (2013年9月、札幌) .
- ④ 古田顕尚、岡本龍史 「イネ卵細胞・受精卵への物質導入系の確立」日本植物学会第77回大会 (2013年9月、札幌) .
- ⑤ Okamoto, T. Proteome and transcriptome analyses toward identification of molecules involving in rice gamete fusion. International symposium on the mechanisms of sexual reproduction in animals and plants (2012年11月, Nagoya, Japan).
- ⑥ 安彦真文、岡本龍史 「イネ単離精細胞、卵細胞および受精卵のオーム解析による配偶子融合関連因子の探索」日本植物生理学会第53回大会 (2012年3月, 京都) .
- ⑦ 岡本龍史、佐藤明子、中島啓介 「受精点と受精卵の極性軸形成および不等分裂面形成位置の関係性」日本植物生理学会第53回大会 (2012年3月, 京都) .

[図書] (計2件)

- ① Okamoto, T. (2014) Gene and protein expression profiles in rice gametes and zygotes: a cue for understanding the mechanisms in gametic and/or early zygotic development of angiosperms. In "Sexual Reproduction in Animals and Plants", Eds, Sawada H., Inoue H., Iwano M., Springer, pp369-382.
- ② 井川智子、東山哲也、岡本龍史 (2014) 「第7章：被子植物の受精2：花粉管の伸長とガイダンス、配偶子の融合、核の合一」、動

植物の受精学：共通機構と多様性、澤田均  
編、化学同人、pp103-118.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/lab0.asp?ID=horcel>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 龍史 (OKAMOTO, Takashi)

首都大学東京・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：50285095